



FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Nucleophosmin
Clone 376
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS652

ENGLISH	
Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Nucleophosmin, Clone 376, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of both wild-type nucleophosmin (NPM) and the mutated counterpart NPMc+. Nucleophosmin is localized in the nuclei of normal cells in multiple tissues, but is aberrantly accumulated in the cytoplasm of leukemic blasts in a large subgroup of acute myeloid leukemia cases with a normal karyotype (1-3). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
Synonyms for antigen	B23, NO38, NPM, numatrin (1).
Summary and explanation	Nucleophosmin (NPM) is a phosphoprotein belonging to the protein family of nucleoplasmins (1). NPM is predominantly localized in the nucleus of cells in many tissues (4). However, NPM has the ability to shuttle between the nucleus and cytoplasm, and this shuttling activity and its proper subcellular localization might be crucial for cellular homeostasis (1). The NPM gene (<i>NPM1</i>) is frequently overexpressed, mutated, deleted or rearranged in many human malignancies, and, depending on its expression level and gene dosage, NPM seems to function as either an oncogene or a tumor suppressor. Complete functional loss of NPM leads to aneuploidy and activation of cell proliferation checkpoints (1). Mutations in exon 12 of the <i>NPM1</i> gene is causal for generation of a mutant NPM counterpart, NPMc, which is aberrantly localized in the cytoplasm of leukaemic blasts cell in a large subgroup of primary acute myeloid leukemia (AML) cases with a normal karyotype (1-4). NPMc display a multilineage distribution in AML specimens of all subtypes except M3 (acute promyelocytic leukemia), M4eo (acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia) and M7 (acute megakaryocytic leukemia) (2, 4). It is likely that mutation and cytoplasmic accumulation of NPMc, called NPMc+, is a primary leukemogenic event, as it may interfere with the normal NPM function. NPMc is not observed in any primary AML cases with a specific genetic abnormality, in secondary AML specimens or hematopoietic or extrahematopoietic neoplasms other than AML (2, 4). NPMc is only observed in primary AML with a normal karyotype (2, 4, 5). Refer to Dako's <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.
Reagent provided	Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide. <u>Clone</u> : 376. <u>Isotype</u> : IgG1, lambda.
Immunogen	Recombinant full length NPM protein.
Specificity	In Western blotting of U937 cell lysates, AML cell line lysates (2), and lysed OCI-AML3 cells (3), the antibody labels a band of 37 kDa corresponding to NPM.
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
Specimen preparation including materials required but not supplied	The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). <u>Paraffin-embedded sections</u> : Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium. <u>Deparaffinized sections</u> : Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.
Staining procedure including materials required but not supplied	The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols: Template protocol: FLEXRTU2 (200 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume) Autoprogram: NPM (without counterstaining) or NPMH (with counterstaining) The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times. All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".

(117051-003)IS652/EFG/MNI/2009.12.04 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17



	Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended. Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include liver and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018) (Code IS750).
Staining interpretation	Cells labeled by the antibody display either nuclear or cytoplasmic and nuclear staining.
Performance characteristics	<u>Normal tissues</u> : The antibody labels wild-type NPM in nuclei of gut, intestine, kidney, liver, lung, lymph node, pancreas, prostate, spleen, thymus and tonsil. Nuclear labeling is observed in all cells in cerebellum but large neurons display additional staining in the cytoplasm. The hepatocytes in the liver show a moderate to strong nuclear staining reaction, whereas the scattered mitotic and post-mitotic cells show a weak to moderate cytoplasmic and nuclear staining reaction. <u>Abnormal tissues</u> : The antibody labeled both the wild-type NPM and mutant NPMc proteins (2, 3) and resulted in both nuclear and cytoplasmic labeling of leukemic blast cells in 208/591 (~35%) primary AML specimens, and in 142/230 (~61%) of primary AML specimens with a normal karyotype. In contrast, nuclear and cytoplasmic labeling of leukemic blast cells was only observed in 24/263 (~9%) AML cases with an abnormal karyotype, and none of these cases represented specific genetic abnormalities commonly observed in primary AML. Nuclear labeling alone was observed in 135/135 (100%) secondary AML specimens and in 980/980 hematopoietic or extrahematopoietic neoplasms other than AML (2).

FRANÇAIS	
Utilisation prévue	Pour utilisation lors d'un diagnostic in vitro. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Nucleophosmin, Clone 376, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps est utile à l'identification de la nucléophosmine de type sauvage (NPM) et la contrepartie mutée NPMc+. La nucléophosmine est située dans le noyau des cellules normales dans de multiples tissus, mais s'accumule de manière aberrante dans le cytoplasme des blastocytes leucémiques dans un grand sous-groupe de cas de leucémie myéloïde aiguë avec caryotype normal (1–3). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.
Synonymes de l'antigène	B23, NO38, NPM, numatrine (1).
Résumé et explication	La nucléophosmine (NPM) est une phosphoprotéine appartenant à la famille protéique des nucléoplasmines (1). La NPM est surtout située sur le noyau des cellules de nombreux tissus (4). Cependant, la NPM a la capacité de passer du noyau au cytoplasme et cette activité et sa localisation intracellulaire normale peuvent être cruciales pour l'homéostasie cellulaire (1). Le gène NPM (<i>NPM1</i>) est souvent surexprimé, muté, supprimé ou réarrangé dans de nombreuses tumeurs malignes humaines, et, en fonction de son niveau d'expression et du dosage du gène, la NPM semble fonctionner soit comme un oncogène soit comme un suppresseur tumoral. La perte fonctionnelle complète de la NPM conduit à une aneuploidie et à une activation des points de contrôle de la prolifération cellulaire (1). Les mutations dans l'exon 12 du gène <i>NPM1</i> entraînent la génération d'une contrepartie NPM mutante, NPMc, qui se situe de manière aberrante dans le cytoplasme des blastocytes leucémiques dans un grand sous-groupe de cas de leucémie myéloïde aiguë (AML) avec caryotype normal (1–4) Le NPMc présente une distribution sur plusieurs lignées dans les échantillons AML de tous les sous-types, à l'exception de M3 (leucémie promyélocytaire aiguë), M4eo (leucémie myélomonocytaire aiguë avec éosinophilie) et M7 (leucémie mégacaryocytaire aiguë) (2, 4). Il est probable que la mutation et l'accumulation cytoplasmique du NPMc, appelée NPMc+, constituent un évènement leucémogène primaire, car elle peut interférer avec la fonction normale de la NPM. Le NPMc n'est observé dans aucun cas AML primaire avec une anomalie génétique spécifique, dans les échantillons AML secondaires ni les néoplasmes hématopoïétiques ou extrahématopoïétiques autres que l'AML (2, 4). Le NPMc est seulement observé dans l'AML primaire avec caryotype normal (2, 4, 5). Se référer aux <i>Instructions générales de coloration immunohistochimique</i> de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.
Réactifs fournis	Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium. <u>Clone</u> : 376. <u>Isotype</u> : IgG1, lambda.
Immunogène	Protéine recombinante NPM de longueur totale.
Spécificité	Dans les analyses par Western blot des lysats de cellules U937, des lysats de lignée cellulaire AML (2) et des cellules lysées OCI-AML3 (3), l'anticorps marque une bande de 37 kDa correspondant à la NPM.
Précautions	1. Pour utilisateurs professionnels. 2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN ₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations. 3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées. 4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau. 5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.
Conservation	Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni	L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm. Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). <u>Coupes incluses en paraffine</u> : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent. <u>Coupes déparaffinées</u> : le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link, en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.
	Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

(117051-003)IS652/EFG/MNI/2009.12.04 p. 2/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume d'application de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume d'application de 300 µL) Programme automatique : NPM (sans contre-coloration) ou NPMH (avec contre-coloration).

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre le foie et les cellules/structures doivent présenter les schémas de réaction décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018) (Code IS750).

Interprétation de la coloration Les cellules marquées par l'anticorps présentent soit une coloration nucléaire, soit une coloration cytoplasmique et nucléaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : l'anticorps marque la NPM de type sauvage dans les noyaux des cellules du tube digestif, des intestins, du rein, du foie, du poumon, des ganglions lymphatiques, du pancréas, de la prostate, de la rate, du thymus et de l'amygdale. Le marquage nucléaire est observé dans toutes les cellules du cervelet mais de grands neurones présentent une coloration supplémentaire du cytoplasme. Les hépatocytes du foie présentent une coloration nucléaire modérée à forte, alors que les cellules disséminées mitotiques et post-mitotiques présentent une coloration nucléaire et cytoplasmique faible à modérée.

Tissus tumoraux : l'anticorps a marqué à la fois les protéines de type sauvage NPM et mutante NPMc (2, 3) et ont entraîné un marquage du noyau et du cytoplasme des blastocytes leucémiques dans 208 échantillons d'AML primaire sur 591 (environ 35 %) et dans 142 échantillons d'AML primaire avec caryotype normal sur 230 (environ 61 %). Par contre, le marquage nucléaire et cytoplasmique des blastocytes leucémiques n'a été observé que dans 24 cas d'AML avec caryotype anormal sur 263 (environ 9 %) et aucun de ces cas n'a présenté les anomalies génétiques spécifiques communément observées dans l'AML primaire. Le marquage nucléaire seul a été observé dans 135 échantillons d'AML secondaire sur 135 (100 %) et dans 980 cas sur 980 de néoplasmes hématopoïétiques et extra-hématopoïétiques autres que l'AML (2).

DEUTSCH	
Verwendungszweck	Zur In-vitro-Diagnostik. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Nucleophosmin, Clone 376, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper ermöglicht die Identifizierung von Wildtyp-Nucleophosmin (NPM) sowie seiner mutierten Form NPMc+. Nucleophosmin findet sich in den Kernen von normalen Zellen mehrerer Gewebearten, tritt jedoch bei einer großen Untergruppe akuter myeloischer Leukämien mit normalem Karyotyp im Zytoplasma leukämischer Blasten in abnormer Häufung auf (1–3). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Untersuchung mit geeigneten Kontrollen ergänzt und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests vorgenommen werden.
Synonyme für das Antigen	B23, NO38, NPM, Numatrin (1).
Zusammenfassung und Erklärung	Nucleophosmin (NPM) ist ein Phosphoprotein aus der Proteinfamilie der Nucleoplasmine (1). In einer Reihe von Geweben findet sich NPM hauptsächlich im Zellkern (4). NPM kann jedoch zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln, und diese Fähigkeit zusammen mit seiner korrekten subzellulären Lokalisierung könnte für die zelluläre Homöostase von entscheidender Bedeutung sein (1). Das NPM-Gen (<i>NPM1</i>) wird bei einer Vielzahl von menschlichen Malignomen häufig überexprimiert und ist mutiert, deletiert oder rearrangiert. Je nach Expressionsniveau und Gendosis scheint NPM entweder als Onkogen oder als Tumorsuppressor zu fungieren. Bei komplettem funktionalen Ausfall von NPM kommt es zu Aneuploidie und Aktivierung von Zellüberwachungsmechanismen (Proliferations-Checkpoints) (1). Mutationen in Exon 12 des <i>NPM1</i> -Gens sind Ursache für die Entstehung einer mutierten Form von NPM, NPMc, die in abnormer Häufung im Zytoplasma leukämischer Blasten bei einer großen Untergruppe primärer akuter myeloischer Leukämien (AML) mit normalem Karyotyp auftritt (1–4). NPMc zeigt eine multilineare Verteilung in AML-Proben aller Untertypen außer M3 (akute promyeloische Leukämie), M4eo (akute myelomonozytische Leukämie mit Eosinophilie) und M7 (akute megakaryozytische Leukämie) (2, 4). Wahrscheinlich sind die Mutation und die zytoplasmische Häufung von NPMc, die als NPMc+ bezeichnet wird, primäre leukämogenische Ereignisse, da sie die normale NPM-Funktion beeinträchtigen können. NPMc wird nicht beobachtet in primären AML-Fällen mit einer spezifischen genetischen Anomalie, in sekundären AML- Fällen und in hämatopoetischen oder extrahämatopoetischen Neoplasmen, die nicht AML sind (2, 4). NPMc wird nur bei primärer AML mit normalem Karyotyp beobachtet (2, 4, 5). Folgende Angaben bitte den <i>Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung</i> von Dako oder der Gebrauchsanweisung für das jeweilige IHC-Detektionsverfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Proben, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.
Geliefertes Reagenz	Gebrauchsfertiger monoklonaler Maus-Antikörper, gelöst in einem Puffer, der Stabilisierungsprotein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält. <u>Klon</u> : 376. <u>Isotyp</u> : IgG1, Lambda.
Immunogen	Rekombinantes NPM-Protein in voller Länge.
Spezifität	Beim Western-Blotting von U937-Zelllysaten, AML-Zelllysaten (2) und lysierten OCI-AML3-Zellen (3) markiert der Antikörper eine Bande mit einem Molekulargewicht von 37 kDa, die NPM entspricht.
Vorsichtsmaßnahmen	1. Nur für Fachpersonal bestimmt. 2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN ₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuftten Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen. 3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden. 4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. 5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.
Lagerung	Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.
Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien	Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden. Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) ist erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) erzielt werden.
(117051-003)	IS652/EFG/MNI/2009.12.04 p. 3/4

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Hinweis: Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Einbettmedium bedecken.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Als Visualisierungssystem wird EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010) empfohlen. Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µl Anwendungsvolumen) oder FLEXRTU3 (300 µl Anwendungsvolumen)

Autoprogramm: NPM (ohne Gegenfärbung) oder NPMH (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der Zusatz-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den Zusatz-Schritt auf „Keine“ einstellen. Dies gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchführen. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Die optimalen Bedingungen können sich je nach Probe und Präparationsverfahren unterscheiden und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten parallel zu den Patientenproben und nach demselben Protokoll angefärbt werden. Das positive Kontrolle sollte Lebergewebe verwendet werden, und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die unter „Leistungsmerkmale“ für dieses Gewebe beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus)) (Code- Nr. K8018) (Code-Nr. IS750).

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen entweder ein nukleäres oder ein zytoplasmatisches und nukleäres Färbemuster auf.

Auswertung der Färbung

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: Der Antikörper markiert Wildtyp-NPM in Zellkernen aus Dickdarm, Dünndarm, Niere, Leber, Lunge, Lymphknoten, Pankreas, Prostata, Milz, Thymus und Mandeln. Nukleäre Markierung zeigt sich in allen Zellen des Zerebellums, große Neuronen weisen zusätzlich Zytoplasmafärbung auf. Die Hepatozyten der Leber zeigen eine mäßige bis starke nukleäre Färbereaktion, die vereinzelt mitotischen und post-mitotischen Zellen zeigen dagegen eine schwache bis mäßige Färbereaktion im Kern und Zytoplasma.

Pathologisches Gewebe: Der Antikörper markierte sowohl Wildtyp-NPM- als auch mutiertes NPMc-Protein (2, 3) und bewirkte eine nukleäre und zytoplasmatische Markierung von leukämischen Blastenzellen in 208 von 591 (~35 %) primären AML-Proben und in 142 von 230 (~61 %) primären AML-Proben mit normalem Karyotyp. Dagegen wurde eine nukleäre und zytoplasmatische Markierung von leukämischen Blastzellen lediglich in 24 von 263 (~9 %) der AML-Fälle mit abnormalem Karyotyp beobachtet, und keiner dieser Fälle wies spezifische genetische Anomalien auf, wie sie häufig bei primärer AML beobachtet werden. Ausschließlich nukleäre Markierung wurde in 135 von 135 (100 %) der sekundären AML-Proben und in 980 von 980 hämatopoetischen oder extrahämatopoetischen Neoplasmen beobachtet, die nicht AML waren (2).

References/ Références/ Literatur			
1.	Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. Nature Rev Cancer 2006;6:493-505.		
2.	Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcaly M, Rosatin R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myogenous leukemia with a normal karyotype. New Engl J Med 2005;352:254-66.		
3.	Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli PM, Liso A, Pucciarini A, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. Blood 2006;107:4514-23.		
4.	Falini B, Martelli PM, Bolli N, Bonasso R, Ghia E, Pallotta MT, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. Blood 2006;108:1999-2005.		
5.	Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarrinni A, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. Blood 2006;108:4146-55		
Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole			
REF	Catalogue number Référence catalogue Bestellnummer	2 °C  8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	 Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Voir les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT Batch code Numéro de lot Chargenbezeichnung	